

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-210082

(P2000-210082A)

(43) 公開日 平成12年8月2日(2000.8.2)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号  | F I           | テマコード*(参考)        |
|---------------------------|-------|---------------|-------------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 M 1/00              |       | C 1 2 M 1/00  | A 4 B 0 2 9       |
| // C 1 2 Q 1/68           |       | C 1 2 Q 1/68  | A 4 B 0 6 3       |

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平11-13986

(22) 出願日 平成11年1月22日(1999.1.22)

(71) 出願人 000000011

アイシン精機株式会社

愛知県刈谷市朝日町2丁目1番地

(72) 発明者 重森 康司

愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会

社アイシンコスモス研究所内

(72) 発明者 服部 篤

愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会

社アイシンコスモス研究所内

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的DNAの固定化

(57) 【要約】

【課題】 標識されたDNAの調製方法の提供。

【解決手段】 標的DNAを含む二本鎖DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列と相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドによる複合体二本鎖DNAの調製、次いで前記二本鎖DNAにおける標的DNAの一部の配列を少なくとも1個の結合パートナーの一員で標識されたdNTPを用いて置換することによる、該結合パートナーの一員で標識されたDNAを調製し、次いで結合パートナーの他の一員を表面に担持する固体支持体に前記標識されたDNAを固定する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 結合パートナーの一員で標識された標的DNAと結合パートナーの他の一員を表面に担持した固体支持体との間で、該一員相互の結合の形成による標的DNAの固体支持体への固定化方法であって、該標識された標的DNAが、(A)ある標的DNAおよび該DNAに対して相補的塩基配列からなる二本鎖DNAと、標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドとの三本鎖DNAを形成する工程、ならびに(B)こうして得られた三本鎖DNAを用いて、少なくとも1種は前記結合パートナーの一員で標識されたdNTPを含むdNTPの存在下で、前記標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列を少なくとも1つは標識されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドで置換する工程、により調製されたものであることを特徴とする、DNAの固定化方法。

【請求項2】 結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる請求項1記載のDNAの固定化方法。

【請求項3】 結合パートナーが、官能基としてそれぞれアミノ基または水酸基とカルボキシル基またはイソシアナートもしくはチオシアナート基を有する原子団からなる請求項1記載のDNAの固定化方法。

【請求項4】 生物学的特異結合を形成する構成員がアビジン類とビオチン類とからなる請求項2記載のDNAの固定化方法。

【請求項5】 工程(A)のオリゴヌクレオチドが標的DNAの3'末端部位に相補的な配列を有する請求項1～4のいずれかに記載のDNAの固定化方法。

【請求項6】 工程(A)における三本鎖DNAの形成が、相同的組換えタンパク質およびアデノシン5'-三リン酸またはアデノシン(γ-チオ)-三リン酸を含有する水性溶液中でのインキュベーションにより、該タンパク質と前記二本鎖DNAおよびオリゴヌクレオチドとの複合体を形成する条件下で行われる請求項1～5のいずれかに記載のDNAの固定化方法。

【請求項7】 相同的組換えタンパク質が大腸菌(*Escherichia coli*)のrecAタンパク質およびrecAに類似の機能を有するタンパク質からなる群のタンパク質から選ばれる請求項6記載のDNAの固定化方法。

【請求項8】 工程(B)がDNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント(クレノウ酵素)、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント(5', 3'エキソマイナス)、T4DNAポリメラーゼおよびT7DNAポリメラーゼ、ならびにこれらの遺伝子改変型ポリメラーゼおよび各種耐熱性DNAポリメラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素の存在下で行われる請求項1～7のいずれかに記載のDNAの固定化方法。

【請求項9】 工程(B)における条件がクレノウ酵素

が存在する条件である請求項8記載のDNAの固定化方法。

【請求項10】 工程(A)で使用するオリゴヌクレオチドが少なくとも10merからなる請求項1～9のいずれかに記載のDNAの固定化方法。

【請求項11】 固体支持体上に少なくとも1つの標的DNAが固定されたDNAチップであって、アビジン類を表面に担持した固体支持体とビオチン類で標識された標的DNAとが、アビジン類-ビオチン類複合体の形成により結合したDNAチップ。

【請求項12】 ビオチン類で標識された標的DNAが、(A)ある標的DNAおよび該DNAに対して相補的塩基配列からなる二本鎖DNAと、標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドとの三本鎖DNAを形成する工程、ならびに(B)こうして得られた三本鎖DNAを用いて、少なくとも1種はビオチン類で標識されたdNTPを含むdNTPの存在下で前記標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列を少なくとも1つはビオチン類で標識されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドで置換する工程、を含んでなる方法により調製される請求項11記載のDNAチップ。

【請求項13】 ビオチン類がビチオン、ビオシチン、デスチオビチン、オキシビオチンまたはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である請求項11または12記載のDNAチップ。

【請求項14】 アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジンまたはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である請求項11または12記載のDNAチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、固体支持体上への標的DNAの固定化方法およびDNAチップに関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子の発現や変異、多型性などの解析の有力な手段として、DNAチップ(またはDNAマイクロアレイ)が提案され、それらの一部は実用化されている。かようなDNAチップの作製方法としては、固体支持体表面を予め陽電荷を帯びるように処理した後、直接DNAを静電的に固体支持体へ固定するか、または固体支持体表面へ合成オリゴヌクレオチドを共有結合を介して固定するか、あるいは固体支持体表面上で直接DNAを合成する方法が知られている。しかし、これらにはそれぞれ一長一短があるが、使用目的に応じて使い分けられている。

【0003】例えば、遺伝子の発現を調べるためには、cDNAやその一部の約200～300bpポリヌクレオチドが固定化に用いられるが、これらのポリヌクレオチドは、一般的に、cDNAやゲノムのライブラリーを

テンプレートにしてPCRで増幅して調製されている。また、このPCRを行う際に、ビオチンやアミノ基で修飾されたプライマーを用い、5'末端が標識されたDNAを取得し、こうして調製されたDNAの末端を介してDNAを固定化する方法も提案されている。しかし、多数のDNA分子を固体支持体上に整列させることが前提となるDNAマイクロアレイを作製するには、多数の標識されたDNAをPCRにより調製することは煩雑であり、また経費もかかる。さらに、PCR法は、そこで用いる酵素（耐熱性酵素）の特性により、PCR産物（DNA）中に塩基の変異を伴う可能性がある。さらにまた、PCR法を用いて調製した、末端標識DNAは、DNAの5'末端が標識されている。そのため、それを用いてDNAチップを作成した場合には、DNAの5'末端が固相表面に向いた構造になる。アプリケーションによっては、この構造が不都合になる場合がある。例えば、DNAチップ上でcDNA合成やRNA合成、それによるタンパク質合成を行う場合には、DNAの3'末端が固相表面に向いた構造が必要不可欠である。

【0004】一方、固体支持体上で直接DNAを合成する方法は、都合よくは、多くて100bpのDNAを固定化できるにすぎない。また、固体支持体上へ静電的にDNAを固定化する方法は、一般的にDNAアレイの密度を高めることが困難である。さらに、こうして得られたDNAアレイは、固体支持体に対するDNAの結合力が弱いので、反復使用することが困難である。さらにまた、DNAアレイ上でとることのできるDNAの構造に起因して、安定なハイブリダイゼーションが達成され難い。

【0005】本発明者らは、生物学的な特異的結合を形成できるか、または化学的な共有結合を形成できる基もしくは部分で、効率よく標的DNAを修飾または標識する方法を探索してきた。その結果、各種生物体において、一本鎖DNAの二本鎖DNAとの複合体の形成を介して進行するとみなされている相同的組換え（または、「普遍的組換え」ともいう）に類する反応に従えば、各種の標識により標識されたヌクレオチドを標的DNA中の一定の箇所に効率よく組み込むことができることを見出した。本発明は、かような知見に基づくものである。

【0006】

【発明の構成】したがって本発明によれば、結合パートナーの一員で標識された標的DNAと結合パートナーの他の一員を表面に担持した固体支持体との間で、該一員相互の結合の形成による標的DNAの固体支持体への固定化方法であって、該標識された標的DNAが、(A)ある標的DNAおよび該DNAに対して相補的塩基配列からなる二本鎖DNAと、標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドとの三本鎖DNAを形成する工程、ならびに(B)こうして得られた三本鎖DNAを用いて、少なくとも1種は前記結合

パートナーの一員で標識されたdNTPを含むdNTPの存在下で、前記標的DNAの一部のオリゴヌクレオチド配列を少なくとも1つは標識されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドで置換する工程、により調製されたものであることを特徴とする、DNAの固定化方法が提供される。

【0007】また、別の態様の本発明として、固体支持体上に少なくとも1つの標的DNAが固定されたDNAチップであって、アビジン類を表面に担持した固体支持体とビオチン類で標識された標的DNAとが、アビジン類-ビオチン類複合体の形成により結合したDNAチップも提供される。

【0008】本発明の固定化方法によれば、三本鎖DNAを形成するのに使用するオリゴヌクレオチドを選ぶことにより、標的DNAの所望の領域における該オリゴヌクレオチドと相補的塩基配列の領域のみを少なくとも1つは結合パートナーの一員で標識（または修飾）されたヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列で特異的に置換することができ、こうして標的DNA中に組み込まれた結合パートナーの一員を介して、結合パートナーの他の一員を担持する固体支持体上へ所望の様式で標的DNAを固定することができる。

【0009】かような固定化方法を利用すれば、固体支持体上へ所望の鎖長のDNAを、所望の結合強度で、きわめて高密度で固定化したDNAマイクロアレイ（またはDNAチップ）を提供することができる。

【0010】

【発明の具体的な態様】まず、本発明および本明細書で、「オリゴヌクレオチド」と称する場合の「オリゴ」の語は、主として標識すべき二本鎖DNAの長さを三本鎖DNAの形成に用いられる一本鎖DNAの長さとして区別する意図で使用しているものであり、当該技術分野で普通に認識されている「オリゴ」の概念に限定されることなく、一般的には「ポリ」の概念をも包含するものとして使用している。また、本発明にいう「DNA」の語は、DNA分子またはDNA断片と互換可能な概念である。

【0011】「結合パートナー」は、相互に結合を形成しうる構成員を意味し、本発明の一つの目的である標的DNAを固体支持体上へ固定しうるものであれば、官能基であるか、分子の一部もしくは残基であるかを問わない。一般的には、結合パートナーは生物学的な特異的結合を相互に形成しうる官能基または分子の一部もしくは残基であるか、あるいは化学的に共有結合を形成しうる官能基または分子の一部もしくは残基であり、かような共有結合は、例えば二官能性の有機化合物由来のスパーサーを介して形成されるものであってもよい。

【0012】生物学的な特異的結合を形成する結合パートナーとしては、限定されるものでないが、ビオチン類-アビジン類、抗原（または抗原決定基）-抗体、オリ

ゴ糖ーレクチン、等の組み合わせが挙げられる。本発明方法に従って作製されるDNAの固定化された固体支持体をDNAチップとして使用する場合には、一定の結合強度を有するためその後のハイブリダイゼーション操作に精度よく反復使用でき、しかも固定化したDNAを再度剥がすことが容易なため固体支持体の再利用が可能な点で、ビオチン類ーアビジン類の結合パートナーを選ぶのが好適である。

【0013】ビオチン類としては、ビオチン、ビオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチンまたはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体が挙げられる。かような安定な複合体を形成しうるとは、ビオチンーアビジン複合体の解離定数 ( $10^{-11}$  M) に近似する解離定数を有する複合体を形成することができることを意味する。一方、アビジン類としては、アビジン、ストレプトアビジンまたはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体が挙げられる。ここにいう、「安定な複合体」の意味も、上記、ビオチン類について定義したのと同義である。また改変体とは、天然由来のアビジンまたはストレプトアビジンの修飾体もしくは断片、あるいはそれらの組換え体を意味する。

【0014】化学的に共有結合を形成しうる官能基または分子の一部もしくは残基については、タンパク質や核酸を固相に共有結合を介して固定化するのに使用されているそれ自体既知のものが使用でき、例えば、アミノ基、水酸基、スルフヒドリル基、カルボキシル基、イソシアナート基、チオイソシアナート基、等それ自体、またはこれらの基を含む原子団が挙げられる。アミノ基を担持するDNAを提供する場合、例えば、後述する置換反応における基質として、dNTPの一部にN<sup>6</sup>- (6-アミノヘキシル) dATPを用いることもできる。

【0015】上記の結合パートナーのうち、標的DNA中の標識とするのに好ましいものとしては、詳細には後述する相同的組換えに悪影響を及ぼさない、ビオチン類や、また、結合パートナーの他の一員、例えばアミノ基を表面に担持する固体支持体が容易に入手できる点を考慮すれば、イソシアナートもしくはチオイソシアナート基を官能基として有する原子団 (例えば、C<sub>1</sub>-<sub>16</sub>の酸素原子で中断されていてもよいアルキレン鎖) を挙げることができる。

【0016】固体支持体としては、結合パートナーの一員相互間の結合形成に悪影響を及ぼさないものであれば、その形状は、例えば、平板、マイクロウェル、ビーズ、ステック等のいずれをとることもできるが、それらの表面の性状は、一般的に非孔質であることが好ましい。このような固体支持体 (以後、固相ともいう) の材料は、ガラス、シリコン、天然もしくは合成樹脂のいずれであってもよい。また、操作の便宜上、固体支持体は磁性体や電極の形態に加工されていてもよい。

【0017】標的DNAは、本発明の目的に沿う限り、

その起源は、長さを問うことなくいかなるDNAの断片であってもよい。一般に、100bp以上、より具体的には、500bp~50kbpのDNAに対して本発明を適用することができる。例えば、人工的な合成DNA、ならびに原核生物および真核生物のあらゆる生物種に由来するDNA断片であって、固相への固定化に技術的意義 (例えば、プローブとして) を有するものであれば、いずれも本発明にいう標的DNAになりうる。特定の標的DNAについて、さらに説明を加えれば、発現の存否を検出するための微生物、高等動物、例えばヒト、サル、マウス由来のDNA、また、いずれかの疾患に関連付けられる遺伝子の全部または一部有するDNAを挙げることができ、また、人工的な合成DNA、例えば、当該技術分野で常用されているDNA自動合成機等を使用して合成された二本鎖DNAも挙げることができる。こうして本発明方法は、例えば、遺伝子の発現や変異、あるいは多型などを調べる上で有用である。

【0018】本発明に従う固定化方法の工程(A)では、標的DNAおよび該DNAに対して相補的塩基配列からなる二本鎖DNAと、標的DNAの一部の領域と相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとの三本鎖DNA複合体が形成される。三本鎖DNA複合体の形成に関与しうるオリゴヌクレオチドは、少なくとも20mer以上、好ましくは40mer以上であり、理論的には上限は存在しないが、実用的には最大150merまでのものが使用できる。標的DNAの一部の領域は、好ましくはその3'末端部位であるが、二本鎖DNAがストレスを受けていて、その領域でオリゴヌクレオチドと三本鎖を形成できる部位であれば、その位置を問わない。末端部位で三本鎖複合体を形成する場合、前記オリゴヌクレオチドは標的DNAにおける末端ヌクレオチドから最大30bpを残したヌクレオチドから始まる上流もしくは下流の相補的なヌクレオチド配列との間であれば、該複合体を形成することができる。前記のストレスを受けているDNAの例としては、超(高次の)らせん構造をとっている核酸分子、DNAトポイソメラーゼ活性によって生じた構造のねじれた核酸分子、などが挙げられる。

【0019】以下、限定されるものでないが、好ましい態様である標的DNAの3'末端部位に標識されたヌクレオチドを組み込む場合について、本発明の固定化方法の工程(A)および(B)について説明する。

【0020】上記三本鎖DNA複合体の形成は、二本鎖DNAとその標的DNAの3'末端部位に相補的塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとを、相同的組換え条件下で接触させる。かような接触は、相同的組換えタンパク質の存在下で行う。

【0021】使用できる相同的組換えタンパク質は、その存在下で標的DNAを含む二本鎖DNA分子と上記オリゴヌクレオチドが、該タンパク質を介して安定な複合

10

20

30

40

50

体を形成しうるものであれば、起源を問うことなく、いかなるタンパク質であってもよい。しかし、かようなタンパク質の具体的なものとしては、大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する *recA* タンパク質、耐熱性細菌 (*Thermus thermophilus*)、他の腸内細菌において、*recA* 遺伝子によりコードされている多機能性タンパク質、また、アグロバクテリウム ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、メチロフィルス メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ウスティラゴ メイディス (*Ustilago maydis*) 等に由来する、それ自体既知の *recA* 類似タンパク質が挙げられる。その他、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) やヒトに由来する *recA* 類似タンパク質も、上記相同的組換えタンパク質に包含される。これらのうち、入手容易性、安定性、機能性の観点から、大腸菌に由来する *recA* タンパク質を使用することが好ましい。

【0022】相同組換えタンパク質を使用する標的DNAを含む二本鎖DNAおよびオリゴヌクレオチドとの三本鎖DNA (または3成分の複合体) の形成に際して、アデノシン5'-三リン酸 (ATP) またはその類縁体、例えばアデノシン (γ-チオ) -三リン酸 (ATP-γS)、あるいはdATP、UTP、dUTP、CTP、dCTPまたはGTPなどを必要とする。本発明に従う、標識された標的DNAを含む二本鎖DNA分子の調製方法における後述する工程(B)でATPが生物学的な分解を伴う場合には、後者のATP-γSを上記3成分複合体の形成に際して使用するのが好ましい。

【0023】かような3成分複合体の形成反応条件は、使用する *recA* タンパク質または *recA* 類似タンパク質に応じて、当業者であれば、後述する実施例に従って、簡単な実験を行うことにより最適の反応条件を容易に選定しうるであろう。

【0024】上記のように、*recA* タンパク質を用いて、3成分複合体を形成した場合には、該複合体から *recA* タンパク質を除去して標識化を行う方法と除去しないで標識化を行う方法といずれを採用してもよい。前者の方法における除去反応は、本発明に従う調製方法に悪影響を及ぼさない限り、いかなる非特異的プロテアーゼを使用して実施することができる。しかし、入手容易性、安定性等を考慮すると、トリチラキウム アルブム (*Trichium album*) 由来のプロティナーゼKを都合よく使用できる。プロティナーゼKを使用するタンパク質の分解反応条件は、当該技術分野で常用されている条件をそのまま、または改変して行うことができる。例えば、0.01M Tris (pH 7.8)、0.005M EDTA、0.5% SDSからなる緩衝液中に、プロティナーゼKを50 μg/mlの濃度で加えて、37°C、10分間インキュベートするような条件下で上記反

応を行う。一方、後者の方法では、*recA* タンパク質が結合したままで、上記三成分複合体を工程(B)のオリゴヌクレオチド配列の置換反応に供することができる。この置換反応は、三本鎖DNAにおける二本鎖DNA上の標的DNAのヌクレオチド配列を、反応液中に基質として加えているヌクレオチドにより、交換する反応をポリメラーゼを用いて行うことにより達成できる。この場合、用いるポリメラーゼは、50°C以上の温度でポリメラーゼの活性を有する酵素が望ましい。例えば、このような酵素として各種耐熱性酵素が挙げられる。

【0025】こうして、上記3成分複合体から必要によりタンパク質を除去して得られる三本鎖DNAは、上記酵素反応液中で安定である。したがって、該タンパク質が存在したそのまま、あるいは該タンパク質を分離した後、本発明に従う、工程(B)のオリゴヌクレオチド配列の置換反応に供することができる。この置換反応は、三本鎖DNAにおける二本鎖DNA上の標的DNAのヌクレオチド配列を、反応液中に基質として加えているヌクレオチドと交換する反応であって、DNAのポリメラーゼを用いて行うことができる。上記工程(B)で用いる酵素は、目的の作用を奏するものであれば、いかなる起源の酵素も使用でき、またそれらの酵素の共存下で行うこともできる。これらの酵素としては、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント (クレノウ酵素)、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント (5'-3' エキソマイナス)、T4 DNAポリメラーゼおよびT7 DNAポリメラーゼ、ならびにこれらの遺伝子改変型DNAポリメラーゼおよび各種耐熱性ポリメラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を挙げることができる。特に、DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント (以下、クレノウ酵素ともいう) を都合よく使用できる。クレノウ酵素は、大腸菌DNAポリメラーゼIのC末端側にある5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性を欠失させたものであって、デオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) の存在下で5'→3'のポリメラーゼ活性を有する。クレノウ酵素は市販されているものを、そのまま使用することができる。

【0026】通常、上記dNTPは、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTPの4種を使用して行うが、これらの少なくとも一部、例えば、dCTPの一部または全部を標識されたdCTPや他の標識されたdNTPに代えて、上記置換反応を行えば、新たに形成されるヌクレオチド配列には、その中に標識されたヌクレオチドを1個以上含めることができる。クレノウ酵素を使用する反応条件それ自体は当該技術分野で周知であり、また、後述する実施例に習って、最適条件を決定することは当業者にとって容易であろう。かような条件の具体例としては、例えば、0.01M Tris (pH 7.5)、0.005M MgCl<sub>2</sub>、0.0075M ジチ

オスレイトールからなる緩衝液中にクレノウ酵素を200 unit/mlの濃度で加えて、37℃、15分間インキュベートするような条件を挙げることができる。

【0027】上記dNTPをビオチン類や他の官能基を有する原子団で標識するのに使用できる標識および標識化方法も、当該技術分野で周知であり、一部の標識されたdNTPは市販されているもの（例えば、ビオチン-11-dCTP）をそのまま使用でき、また目的に応じて新たな標識されたdNTPを作成してもよい。

【0028】以上により、得られる標識された二本鎖DNAは、それらが有する標識（結合パートナーの員）と他の一員を表面に有する固体支持体とを、それ自体既知の適当な水性溶媒中でインキュベートする方法により固相へ固定化できる。こうして固相へ固定化された二本鎖DNAは、通常のDNA変性条件下で変性した後、遊離する一本鎖DNAを洗い流すことにより、標的DNAのみが固相に固定化された、所謂、DNAアレイまたはDNAチップとすることができる。

【0029】本発明の固定化方法により標的DNAが固定化された固体支持体は、例えば、標識としてアビジン類が複数組み込まれている場合には、複数箇所標的DNAが固定化された新規な構造物をもたらす。したがって、本発明によれば、かかる構造を有するDNAチップも提供される。より具体的には、かようなDNAチップとしては、上記の本発明に従う標的DNAの固定化方法により作製されたものを挙げることができる。

【0030】

【実施例】本発明を以下の実施例により、さらに具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明の理解を容易にするためのものであって、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

【0031】実施例1

標識反応における、各反応成分の依存性

標的DNAとしてファージベクターM13mp18RF

DNA（宝酒造より入手可）を制限酵素SnaBIで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60-merのオリゴヌクレオチド1を用意した。標的DNAとオリゴヌクレオチド1との間の三本鎖形成反応を行うために、2つの反応液A（20μl）と反応液B（20μl）を準備した。反応液Aには、5pmolのオリゴヌクレオチド1、6.0μgのrecAタンパク、0.48mM ATP-γS、30mM酢酸トリス（pH7.2）、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200ngのターゲットDNA、0.48mM ATP-γSを、30mM酢酸トリス（pH7.2）、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0032】反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。三本鎖形成反応を

終えた反応液40μlに、0.5%（W/V）SDS、0.7mg/mlプロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除recA処理を行った。その後、60μlのTE緩衝液（10mM Tris-HCl、1mM EDTA）を加え、100μlとして、フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10.5μlの蒸留水に溶かした後、10mM Tris-HCl pH7.5、5mM MgCl<sub>2</sub>、7.5mMジチオスレイトール、4unitクレノウ・フラグメント（Klenow fragment）、0.02mM α-32P dCTP、0.02mM dGTP、0.02mM dATP、0.02mM dTTP中で、37℃で30分間インキュベートすることにより、標識反応を行った。

【0033】TE緩衝液を10μl加え、G25スピナラムで過剰なα-32P dCTPを除去した後、その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を、残りの半分量については0.7%アルカリ変性ゲル電気泳動を行った。アガロースゲル電気泳動については、泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。その結果を図1（B）のレーン1に示す。その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。アガロースゲル電気泳動の結果を図1（A）のレーン1に、アルカリ変性ゲル電気泳動の結果を図1（C）のレーン1に示す。

【0034】比較実験として、次のことを行った。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、λDNAを制限酵素HindIIIで切断し、[γ-32P]ATPで5'末端標識したものである。レーン2は、recAを加えないで反応を行った以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、ATP-γSを加えないで反応を行った以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン4は、逆相補配列をもつオリゴヌクレオチド2を用いて反応を行った以外はレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン5は、pBR322 DNA配列をもつオリゴヌクレオチド3を用いて反応を行った以外はレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。

オリゴヌクレオチド1の配列：5'-agagggctttg aggcac taaag actttttcatgaggaagt ccattaaacg ggtaaaata c-3'（配列番号：1）

オリゴヌクレオチド2の配列：5'-gtattttacc cgttt aatgg aaacttcctcatgaaaaagt cttagtcct caaacctc t-3'（配列番号：2）

オリゴヌクレオチド3の配列：5'-cact gcataattct



cttactgtcatgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtg  
agt-3' (配列番号: 3)

図1 (A)、(B)および(C)によれば、図1 (A)のレーン1に示すように、標的DNAの標識反応には、レーン1の結果をもたらす各種処理条件が必要であることがわかる。また、図1 (C)のレーン1に示すように、標識が入るのは標的DNAであり、標識の入った標的DNAは標識を入れる前の標的DNAの長さと同じであることがわかる。

#### 【0035】実施例2

標識された標的DNA鎖長

図2 (A)のレーン1は、標的DNAとしてM13mp18RF DNAの制限酵素HincIIで切断したものをを用いたことと、その末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド4を用いたこと以外は、図1 (A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。比較実験として、レーン2は、オリゴヌクレオチドを加えないで、レーン1と同じ反応を行った結果に由来する。図2 (B)はゲルの染色写真である。図2 (C)のレーン1は、(A)のレーン1で得られたサンプルを、制限

酵素BsaHIで切断して、4.5%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動したものである。レーン2は、(A)のレーン2で得られたサンプルを制限酵素BsaHIで切断してレーン1と同様に電気泳動したものである。レーンMは、DNAサイズマーカーを示し、その1つのサイズを(C)の左端に示す。

オリゴヌクレオチド4の配列: 5' -ggaacagct atgac  
catga ttacgaattcgaagctcggta cccgggagtc ctctagaagt  
c-3' (配列番号: 4)

図(A)、(B)および(C)によれば、(C)のレーン1に示すように、標識されたDNAは2本鎖の標的DNAの片側の一本鎖であり、その完全長である263bpの長さであることがわかる。

#### 【0036】実施例3

標識反応における、塩基配列特異性

図3 (A)のレーン1は、図1 (A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、pBR322 DNA (宝酒造より入手)の配列を持つオリゴヌクレオチド3を用いたこと以外はレーン1と同じ反応を行った結果に由来する。レーン3は、標的DNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したものをを用いたことと、その末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド3を用いたこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン4は、標的DNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したものをを用いたことと、M13mp18RF DNAの配列を持つオリゴヌクレオチド1を用いたこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来する。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

【0037】図3 (A)および(B)によれば、標識反応は、三本鎖形成の反応液中に、標的DNAの末端部位のオリゴヌクレオチド配列と標識反応に用いるオリゴヌクレオチドの配列とが実質的に同一であることが必要であることを示す。

#### 【0038】実施例4

標識反応における、標的DNAの標識部位

図4 (A)のレーン1は、図1 (A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2

10 は、ファージベクターM13mp18RFのSnaBI断片のもう一つの片末端側のヌクレオチド配列に対応するレーン1と同一のサンプルを制限酵素EcoRIで切断して電気泳動したものである。レーン3は、オリゴヌクレオチド5を用いたこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン4は、レーン3と同じサンプルを、制限酵素EcoRIで切断して電気泳動したものである。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

オリゴヌクレオチド5の配列: 5' -tggttttagtg tattc  
tttcg cctctttcgttttaggttg tgcccttcgta gtggcatta  
c-3' (配列番号: 5)

図4 (A)および(B)によれば、レーン2とレーン4に示すように、それぞれ標的DNAの片側末端部位の配列をもつ2種のオリゴヌクレオチド1と5を用いて一連の反応を行った場合、標的DNA上で、それぞれそれらのオリゴヌクレオチドが三本鎖形成する末端部位が標識されていることがわかる。

#### 【0039】実施例5

標識反応における、標的DNAの標識部位

30 図5 (A)のレーン1は、標的DNAとしてM13mp18RF DNAを制限酵素HincIIで切断したものをを用いたことと、その末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド6を用いたこと以外は、図1 (A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素XbaIで切断したサンプルの電気泳動の結果である。レーン3は、レーン1と同一のサンプルを、制限酵素BamHIで切断したサンプルに由来するものである。レーン4は、レーン1と同一のサンプルを、制限酵素SmaIで  
40 切断したサンプルに由来するものである。レーン5は、レーン1と同一のサンプルを、制限酵素KpnIで切断したサンプルに由来するものである。レーン6は、レーン1と同一のサンプルを、制限酵素SacIで切断したサンプルに由来するものである。レーン7は、レーン1と同一のサンプルを、制限酵素EcoRIで切断したサンプルに由来するものである。レーン8は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素BsaHIで切断したサンプルに由来するものである。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

50 オリゴヌクレオチド6の配列: 5' -ttacgaattc gaagct



ccgta cccggggatcctctagatc-3' (配列番号: 6)

図5 (A) および (B) によれば、レーン1からレーン2に示すように、標的DNAの標識が入っている部位を端から制限酵素を用いて順に切断していくと、標識シグナルがそれに応じて減少していくことから、標的DNAの標識される部位は、DNAの末端領域であることがわかる。さらに、標識される部位は、オリゴヌクレオチドの長さの範囲内で、かつ、均一に標識されていることがわかる。

#### 【0040】実施例6

異なるDNAポリメラーゼを用いる標識反応

図6 (A) のレーン1は、標識反応で大腸菌 (*E. coli*) DNAポリメラーゼIを用いたこと以外は、図1

(A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、標識反応で大腸菌DNAポリメラーゼIを用いたことと、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン3は、大腸菌DNAポリメラーゼI、ラージ・フラグメント (*Large fragment*) で標識反応を行ったこと以外は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン4は、大腸菌DNAポリメラーゼIの *Large fragment* で標識反応を行ったことと、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン5は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン6は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。

【0041】図6 (A) および (B) によれば、どんな種類のDNAポリメラーゼI酵素でも、標識反応に用いることができることがわかる。また、レーン6に示すように、バックグラウンドシグナルを低くするためには、大腸菌DNAポリメラーゼIの *Large fragment* (3'-5' *exo* マイナス) で標識反応を行うことが望ましいこともわかる。

#### 【0042】実施例7

異なるDNAポリメラーゼを用いる標識反応

図7 (A) のレーン1は、図1 (A) のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン7は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、図1 (A) のレーン1と同じ反応を行った結果に由来する。レーン2は、標的DNAとしてM13mp18RF DNAを制限酵素 *SnaBI* で直鎖状にしたものと、オリゴヌクレオチド1との間で三本鎖形成を行った結果に由来する。その反応は、2つの反応液A (20  $\mu$ l) と反応液B (20  $\mu$ l) を準備した。反応液Aには、5 pmolのオリゴヌクレオチド1、6.0  $\mu$ gの *recA* タンパク、0.48 mM ATP- $\gamma$ S、30

mM酢酸トリス (pH 7.2)、2.5 mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200 ngの標的DNA、0.48 mM ATP- $\gamma$ Sを、30 mM酢酸トリス (pH 7.2)、2.15 mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0043】反応液AとBを、それぞれ37°Cで15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37°Cで30分間インキュベートした。この時点での、組み換え反応後の反応液量は40  $\mu$ lであった。その10  $\mu$ lに、10 mM Tris-HCl pH 7.5、5 mM MgCl<sub>2</sub>、7.5 mMジチオスレイトール、4 unit Klenow fragment、0.02 mM  $\alpha$ -32P dCTP、0.02 mM dGTP、0.02 mM dATP、0.02 mM dTTPを含んだ反応液20  $\mu$ l中で、37°Cで60分間インキュベートした。全量に0.5% (W/V) SDS、0.7 mg/ml プロティナーゼKを加え37°Cで10分間インキュベートした後、TE緩衝液を30  $\mu$ l加え、G25 スピナラムで過剰な  $\alpha$ -32P dCTPを除去した。その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後に、エチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を取りDNAを観察した。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。

【0044】レーン8は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン2と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、標識反応を45°Cで行ったこと以外は、レーン2と同様の反応を行った結果に由来する。レーン9は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン3と同じ反応を行った結果に由来する。レーン4は、標識反応を、20 mM Tris-HCl pH 8.8、10 mM KCl、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2 mM MgSO<sub>4</sub>、0.1% Triton X-100、5 unit *Bst* DNA Polymerase *large fragment*、0.02 mM  $\alpha$ -32P dCTP、0.02 mM dGTP、0.02 mM dATP、0.02 mM dTTPを含んだ反応液20  $\mu$ l中で、65°Cで60分間インキュベートした。レーン2と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン10は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン4と同様の反応を行った結果に由来する。レーン5は、標識反応を、20 mM Tris-HCl pH 8.3、10 mM KCl、6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、5 unit *PyroBest* DNA Polymerase *large fragment*、0.02 mM  $\alpha$ -32P dCTP、0.02 mM dGTP、0.02 mM dATP、0.02 mM dTTPを含んだ

反応液20 $\mu$ l中で、65℃で60分間インキュベートしたこと以外は、レーン2と同様の反応を行った結果に由来する。レーン11は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン5と同様の反応を行った結果に由来する。レーン6は、標識反応を、10mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、5units Taq DNA Polymerase large fragment、0.02mM  $\alpha$ -32PdCTP、0.02mM dGTP、0.02mM dATP、0.02mM dTTPを含んだ反応液20 $\mu$ l中で、65℃で60分間インキュベートしたこと以外は、レーン2と同様の反応を行った結果に由来する。レーン12は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン6と同様の反応を行った結果に由来する。(B)は(A)と同様のアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

【0045】図7(A)および(B)によれば、レーン4に示すように、耐熱性のBst DNAポリメラーゼを用いて標識反応を行うことにより、除recA処理を行わないで標識反応を行うことができる。また、レーン1とレーン4を比較すると、その標識効率は、除recAを行って標識反応を行う場合と、ほぼ同じであることがわかる。

#### 【0046】実施例8

閉環状の標的DNAを用いた標識反応

標的DNAとして閉環状のDNA(pBR322 DNA)と、その1部位の配列を持つ120-merのオリゴヌクレオチド7を用意した。標的DNAとオリゴヌクレオチド7との間の三本鎖形成反応を行うために、2つの反応液A(20 $\mu$ l)と反応液B(20 $\mu$ l)を準備した。反応液Aには、5pmolのオリゴヌクレオチド8、6.0 $\mu$ gのrecAタンパク、0.48mM ATP- $\gamma$ S、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれている。反応液Bには、200ngの標的DNA、0.48mM ATP- $\gamma$ Sを、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0047】反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。この時点での三本鎖形成反応を終えた反応液40 $\mu$ lに、0.5%(W/V) SDS、0.7mg/mlプロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除recA処理を行った。その後、60 $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA)を加え、100 $\mu$ lとして、フェノール・クロロホルム抽出を1回、クロロホルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10.5 $\mu$ lの蒸留水に溶かした

後、10mM Tris-HCl pH7.5、5mM MgCl<sub>2</sub>、7.5mMジチオスレイトール、4units Klenow fragment、0.02mM  $\alpha$ -32P dCTP、0.02mM dGTP、0.02mM dATP、0.02mM dTTP中で、37℃で30分間インキュベートすることにより、標識反応を行った。TE緩衝液を10 $\mu$ l加え、G25スピンカラムで過剰な $\alpha$ -32P dCTPを除去した後、その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。結果を図8(B)のレーン1に示す。その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。アガロースゲル電気泳動の結果を図8(A)のレーン1に示す。

【0048】比較実験として、次のことを行った。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素HindIIIで切断し、[ $\gamma$ -32P]ATPで5'末端標識したものである。レーン4は、用いた標的DNAをそのまま電気泳動したものである。レーン2は、逆相補オリゴヌクレオチド8を用いたこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン3は、オリゴヌクレオチド加えないで反応を行ったこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来する。

オリゴヌクレオチド7の配列: 5'-gtcctccgat cgttgcaga agtaagttggccgcagtggt atcactcatg gttatggcaq cactgcataa ttctcttact gtcattgccatccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt-3' (配列番号: 7)

オリゴヌクレオチド8の配列: 5'-actcaccagt cacagaaaag catcttacggatggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcggccaacttact tctgacaacg atcggaggac-3' (配列番号: 8)

図8(A)および(B)によれば、レーン1と2に示すように、三本鎖形成体が安定に保持されており、閉環状DNAを標的DNAとして用いることで、DNAのどここの部位でも標識をいれることができることがわかる。

#### 【0049】実施例9

標識反応後のオリゴヌクレオチドの状態

標的DNAとしてM13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60-merのオリゴヌクレオチド1を用意した。オリゴヌクレオチドは、[ $\gamma$ -32P]ATPで5'末端を事前に標識しておいた。標的DNAとオリゴヌクレオチド1との間の三本鎖形成反応は、2つの反応液A(20 $\mu$ l)と反応液B(20 $\mu$ l)を準備した。反応液Aには、1pmolのオリゴヌクレオチド1、6.0 $\mu$ gのrecAタンパク、0.48mM ATP- $\gamma$ S、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれている。反応液Bには、200ngの標的DNA、0.48mM ATP- $\gamma$ Sを、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれる。

2)、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200ngの標的DNA、0.48mM ATP- $\gamma$ Sを、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0050】反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。この時点での三本鎖形成反応を終えた反応液40 $\mu$ lに、0.5%(W/V) SDS、0.7mg/ml プロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除recA処理を行った。その後、60 $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA)を加え、100 $\mu$ lとして、フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10.5 $\mu$ lの蒸留水に溶かした後、10mM Tris-HCl pH7.5、5mM MgCl<sub>2</sub>、7.5mMジチオスレイトール、4unit Klenow fragment、0.02mM dCTP、0.02mM dGTP、0.02mM dATP、0.02mM dTTP中で、37℃で30分間インキュベートすることにより取り込み反応を行った。反応終了液に、0.5%(W/V) SDS、0.7mg/ml プロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除タンパク処理を行った。その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。結果を図9(B)に示す。その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。その結果を図9(A)のレーン2で示す。

【0051】比較実験として、次のことを行った。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素HindIIIで切断し、[ $\gamma$ -32P] ATPで5'末端標識したものである。レーン1は、レーン2と同様に三本鎖形成を行い、取り込み反応を行わないで電気泳動したもの。レーン3は、レーン2と同様に三本鎖形成を行い、取り込み反応で4種のdNTPsを加えないで反応を行った結果に由来する。レーン4は、レーン2と同様に三本鎖形成を行い、取り込み反応でdATPを加えないで反応を行った結果に由来する。レーン5は、レーン2と同様に三本鎖形成を行い、取り込み反応でdCTPを加えないで反応を行った結果に由来する。

【0052】図9(A)および(B)によれば、レーン2に示すように、DNAポリメラーゼによる4種類のdNTPsの取り込み反応を行った後には、三本鎖形成に用いたオリゴヌクレオチドがターゲットDNAから解離していることがわかる。

### 【0053】実施例10

#### 標識反応の再現性

図1(A)のレーン1と同様の反応を行ったサンプルで電気泳動する前のものを、フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。こうして得られるDNAを標的DNAとして用いてオリゴヌクレオチド1との間で三本鎖形成を行った。反応は、2つの反応液A(20 $\mu$ l)と反応液B(20 $\mu$ l)を準備した。反応液Aには、1pmolのオリゴヌクレオチド1、6.0 $\mu$ gのrecAタンパク、0.48mM ATP- $\gamma$ S、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.5mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200ngのターゲットDNA、0.48mM ATP- $\gamma$ Sを、30mM酢酸トリス(pH7.2)、2.15mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0054】反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。この時点での三本鎖形成反応を終えた反応液40 $\mu$ lに、0.5%(W/V) SDS、0.7mg/ml プロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除recA処理を行った。その後、60 $\mu$ lのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA)を加え、100 $\mu$ lとして、フェノール・クロロフォルム抽出を1回、クロロフォルム抽出を1回行った後、エタノール沈殿法を行い、含まれるDNA分子を濃縮分離した。DNA沈殿を10.5 $\mu$ lの蒸留水に溶かした後、10mM Tris-HCl pH7.5、5mM MgCl<sub>2</sub>、7.5mMジチオスレイトール、4unit Klenow fragment、0.02mM dCTP、0.02mM dGTP、0.02mM dATP、0.02mM dTTP中で、37℃で30分間インキュベートすることにより取り込み反応を行った。反応終了液に、0.5%(W/V) SDS、0.7mg/ml プロティナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除タンパク処理を行った。その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。結果を図10(B)に示す。その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。その結果を図10(A)のレーン1に示す。レーン2は、取り込み反応でDNAポリメラーゼを加えないでレーン1と同様の反応を行った結果に由来する。レーン3は、取り込み反応で4種類のdNTPsを加えないでレーン1と同じ反応を行った結果に由来する。レーン4は、取り込み反応でdCTPのみを加えてレーン1と同じ行った結果に由来する。

【0055】図10(A)および(B)によれば、標識反応により標的DNAに取り込まれた標識は、くり返し行う一連の本発明に従う反応により、dNTPsでの取り込み反応を行うことで、その標識がはじき出されることから、反応に再現性があることが確認される。

#### 【0056】実施例11

標識核酸の磁気ビーズへの固定化

標識反応を、10mM Tris-HCl pH7.5、MgCl<sub>2</sub>、7.5mMジチオスレイトール、2 unit Klenow fragment、0.2mM dCTP、0.2mM dGTP、0.2mM dATP、0.2mM dTTPを含んだ反応液30μl中で、37℃で30分間インキュベートしたこと以外は、図1(A)のレーン1と同様の反応を行った。電気泳動させる前のサンプルのストレプトアビジンビーズ(Dynabeads M-280 Streptavidin)への固定化は、次のように行った。

【0057】25μl(10μg/μlのストック溶液)のDynabeadsを、100μlの6×SSC(0.5M塩化ナトリウム、0.05Mクエン酸ナトリウム)で1回洗浄した後、30μlの上記反応液に懸濁した。室温で30分間放置した後、Magnetic particle concentratorでDynabeadsを回収した。100μlのTE緩衝液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA)で2回洗浄した後、100μlのアルカリ変成溶液(0.125M NaOH、0.1M NaCl)に懸濁し、室温で5分置いた。さらに3回、アルカリ変成溶液による洗浄を行った。100μlのTE緩衝液で4回洗浄した後、25μlのTE緩衝液に懸濁した。固相上にDNAが付着しているか、また、DNAの全長のものが付着しているかについては、PCRにより確認した。

【0058】PCRは、そのDynabeads懸濁液の5μlをとりそれを鋳型として、50μlの反応液で行った。用いた、プライマーはM13mp18RF DNA末端の35-merのプライマー1と、もう一方のM13mp18RF DNA末端の35-merのプライマー2を用いて、27 cycle(98℃-20 sec、68℃-5 min)で常法に従って行った。PCR産物の一部は、1%アガロースゲル電気泳動を行い、泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。

【0059】結果を図11に示す。レーン2は、レーン1と同様の反応を、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、制限酵素SnaBIで切断M13mp18RF DNAのもう1つの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチド6を用いて行った結果に由来するサンプルに対するものである。レーン3は、レーン1と同じ反応を、オリゴヌクレオチドを加えないで行った結果に由来するものである。レーン4

は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断したターゲットDNAを鋳型としてPCRを行ったサンプルで、PCR産物のサイズマーカーに由来するものである。また一部は、pGEM-T vector(Promega社製)にサブクローニングした後、インサートが入っている40個のクローンについて、ターゲットDNA末端部位の塩基配列決定を行った。

プライマー1: 5'-gtattttaccgcgttaatggaaacttcctcatgaa-3' (配列番号: 9) プライマー2: 5'-gtaatgcactacgaaggcaccacctaataacgaa-3' (配列番号: 10) 図11によれば、ビオチン標識ヌクレオチドが、本反応により標的DNAに取り込まれ、そのビオチンを取り込んだ標的DNAは、ストレプトアビジンコートの磁気ビーズに結合することがわかる。また、標識の入った標的DNAの塩基配列は、反応する前の標的DNAの塩基配列と実質的に同一であることがわかる。

#### 【0060】実施例12

生体分子間相互作用解析測定装置(Affinity Sensors社製、IASysの使用例)

まず、図11(A)のレーン1と同様の反応により、ビーズと結合させる直前のビオチン標識DNAを調製した。IASysでの測定のための、ビオチン結合IASysセンサー表面(ビオチン結合IASysキューベット)への上記標識核酸の固定化は以下のように行った。

【0061】(a) キューベットの洗浄: 200μlの1倍濃度PBS-T溶液(100mM Tris-HCl pH7.5、150mM CaCl<sub>2</sub>、0.05% Tween 20)を注入し、5回洗浄した。

【0062】(a) ストレプトアビジンの結合: 100μlの1mg/ml濃度のストレプトアビジンを注入し、25℃で30分間置いた。

【0063】(a) 未反応ストレプトアビジンの除去: 200μlの1倍濃度PBS-T溶液を注入し、5回洗浄した。

【0064】(a) 核酸の固定化: 上記、ビオチン標識核酸溶液に1倍濃度になるようにPBS-T溶液を加え100μlとした後、キューベットに注入し、25℃で30分間置いた。

【0065】(a) 未反応核酸の除去: 200μlの1倍濃度PBS-T溶液を注入し、5回洗浄した。

【0066】(b) 2本鎖核酸の変性処理: 100μlのアルカリ変成溶液(0.125M NaOH、0.1M NaCl)を注入し、室温で5分置いた。さらに3回、アルカリ変成溶液による注入を行った後、200μlの6倍濃度SSC溶液で5回洗浄した。

【0067】(c) 一本鎖DNAの注入: あらかじめ100μlの6倍濃度SSC溶液を注入したキューベットに、固定化した核酸に相補的な配列をもつ環状一本鎖DNA(M13mp18 ss DNA)を100ngを注入し、IASysでその結合を測定した。

【0068】(d) 2本鎖核酸の変性処理: 100  $\mu$ lのアルカリ変成溶液(0.125M NaOH、0.1M NaCl)を注入し、室温で5分置いた。さらに3回、アルカリ変成溶液による注入を行った後、200  $\mu$ lの6倍濃度SSC溶液で5回洗浄した。

【0069】(e) 一本鎖DNAの注入: あらかじめ100  $\mu$ lの6倍濃度SSC溶液を注入したキューベットの、固定化した核酸の配列を持たない環状一本鎖DNA( $\phi$ ×174 ssDNA)を100 ngを注入し、IAsysでその結合を測定した。

【0070】(f) 固定化した核酸に相補的な配列をもつ環状一本鎖DNA(M13mp18 ssDNA)を100 ngを注入し、IAsysでその結合を測定した。

【0071】以上の一連の測定結果を、図12に示す。

【0072】図12によれば、標的DNAを官能基で標識することにより、そのDNAをセンサー表面などの固相上に強固に固定化できることが確認される。また、固定化される2本鎖DNAは、片側DNA鎖のみ標識されていることから、固相上で1本鎖に変性させることが可能であり、その1本鎖に相補的なDNAをハイブリさせることで、DNA検出を行うことができる。

#### 【0073】実施例13

三本鎖形成反応における、各反応成分の依存性  
標的DNAとしてM13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで直鎖状にしたものと、その標的DNAの末端部位の配列を持つ60-merのオリゴヌクレオチド1を用意した。オリゴヌクレオチドは、[ $\gamma$ -32P]ATPで5'末端を標識した。標的DNAとオリゴヌクレオチド1との間の三本鎖形成反応は、2つの反応液A(20  $\mu$ l)と反応液B(20  $\mu$ l)を準備した。反応液Aには、1 pmolのオリゴヌクレオチド1、6.0  $\mu$ gのrecAタンパク、0.48 mM ATP- $\gamma$ S、30 mM酢酸トリス(pH7.2)、2.5 mM酢酸マグネシウムが含まれる。反応液Bには、200 ngの標的DNA、0.48 mM ATP- $\gamma$ Sを、30 mM酢酸トリス(pH7.2)、2.15 mM酢酸マグネシウムが含まれる。

【0074】反応液AとBをそれぞれ37℃で15分間インキュベートした後、2つを混ぜ合わせて、さらに37℃で30分間インキュベートした。この時点での三本鎖形成反応を終えた反応液40  $\mu$ lに、0.5%(W/V) SDS、0.7 mg/mlプロテイナーゼKを加え、37℃で10分間インキュベートすることにより、除recA処理を行った。その半分量については1%アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後にエチジウムブロミド染色を行いゲルの写真を記録した。結果を図13(B)に示す、その後、ゲルをろ紙の上に載せてゲル乾燥器で乾燥させた。シグナルの検出は、乾燥させたゲルのオートラジオグラムをとり、X線フィルム上に記録した。その結果を図13(A)のレーン1に示す。

【0075】比較実験として、次のことを行った。レーンMは、DNAサイズマーカーで、図面の左端にそのサイズを示す。このサイズマーカーは、 $\lambda$  DNAを制限酵素HindIIIで切断し、[ $\gamma$ -32P]ATPで5'末端標識したものである。レーン2は、recAを加えないで反応を行った以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、ATP- $\gamma$ Sを加えないで反応を行った以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン4は、逆相補オリゴヌクレオチド2を用いて反応を行った以外はレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン5は、逆相同な配列を持つオリゴヌクレオチド11を用いて反応を行った以外はレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン6は、オリゴヌクレオチド3を用いて反応を行った以外はレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン7は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したターゲットDNAに対するオリゴヌクレオチド3を用いて、反応を行った結果に由来するサンプルの電気泳動である。レーン7は、ターゲットDNAとして、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したものを用いたことと、その末端部位の配列をもつ標識オリゴヌクレオチド5を用いたこと以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。オリゴヌクレオチド10の配列: 5' -tctccgaaac tcc tgatttc tgaaaaagtactcttcaaa ggtaatttc ccatatt atq-3' (配列番号: 11)

図13(A)のレーン1に示すように、三本鎖形成には、レーン1の基となる全ての反応成分を反応に加える必要がある。また、逆相補オリゴヌクレオチドと逆相同オリゴヌクレオチドでは、三本鎖形成体は得られないことから、オリゴヌクレオチドの方向性は一方のみであることがわかる。

#### 【0076】実施例14

三本鎖形成反応における、用いるオリゴヌクレオチドの配列方向性

図14(A)のレーン1は、図13(A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、逆相補な配列をもつ標識オリゴヌクレオチド2を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、標識オリゴヌクレオチド6を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン4は標識オリゴヌクレオチド12を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。(B)は(A)と同様のアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

オリゴヌクレオチド11の配列: 5' -gtaatgccac tac gaaqcca ccaacctaaaacgaaagagg cgaagaata cactaaa aca-3' (配列番号: 12)

図14(A)および(B)によれば、直鎖状標的二本鎖

DNAの両末端部位で三本鎖形成が可能であり、そのとき用いるオリゴヌクレオチドは、標的二本鎖DNAの両末端配列の一方の方向を持った相同配列でなければならないことがわかる。

#### 【0077】実施例15

三本鎖形成反応に必要とされる。オリゴヌクレオチド鎖長

図15(A)のレーン1は、図13(A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、レーン1で用いたオリゴヌクレオチドの5'末端部位を10-mer削った標識オリゴヌクレオチド12を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、レーン1で用いたオリゴヌクレオチドの5'末端部位を20-mer削った標識オリゴヌクレオチド13を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン4は、レーン1で用いたオリゴヌクレオチドの5'末端部位を30-mer削った標識オリゴヌクレオチド14を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン5は、レーン1で用いたオリゴヌクレオチドの5'末端部位を40-mer削った標識オリゴヌクレオチド15を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。

(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

オリゴヌクレオチド12の配列: 5'-aggactaaag actttttcat gaggaaqgtttccattaaacg ggtaaaatac-3' (配列番号: 13)

オリゴヌクレオチド13の配列: 5'-actttttcat gaggaaqgttt ccattaaacgggtaaaatac-3' (配列番号: 14)

オリゴヌクレオチド14の配列: 5'-gaggaaqgttt cca ttaacg ggtaaaatac-3' (配列番号: 15)

オリゴヌクレオチド15の配列: 5'-ccattaaacg ggt aaaatac-3' (配列番号: 16)

図15(A)および(B)によれば、三本形成に必要なオリゴヌクレオチドの長さは、40-mer以上が必要であることがわかる。また、三本鎖形成効率は、オリゴヌクレオチドの長さが長い方が高いことがわかる。

#### 【0078】実施例16

三本鎖形成反応に必要とされる。オリゴヌクレオチド配列位置関係

図16(A)のレーン1は、図13(A)のレーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン2は、ターゲットDNAの末端10-merを残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド16を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。レーン3は、ターゲットDNAの末端20-merを残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド17を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った

結果に由来するものである。レーン4は、ターゲットDNAの末端30-merを残した末端部位の配列をもつオリゴヌクレオチド18を用いた以外は、レーン1と同様の反応を行った結果に由来するものである。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。

オリゴヌクレオチド16の配列: 5'-caacggctac agaggctttg aggactaaagactttttcat gaggaaqgttt ccattaaacg-3' (配列番号: 17)

オリゴヌクレオチド17の配列: 5'-acgagggtag caacggctac agaggctttgaggactaaag actttttcat gaggaaqgttt-3' (配列番号: 18)

オリゴヌクレオチド18の配列: 5'-cagcatcgga acgagggtag caacggctacagaggctttg aggactaaag actttttcat-3' (配列番号: 19)

図16(A)および(B)によれば、三本形成に必要なオリゴヌクレオチド配列の位置は、ターゲットDNAの末端から20-mer以内の領域の配列を持つものから、直鎖状ターゲットDNAの末端をおおう配列を持つものまでが必要である。また、直鎖状ターゲットDNAの末端まで、または、末端をおおう配列を持つオリゴヌクレオチドを用いた方が、より三本鎖形成効率は高いことがわかる。

#### 【0079】実施例17

三本鎖形成反応における、オリゴヌクレオチド配列の熱安定性

図13(A)のレーン1と同様の反応を行ったサンプル10μlに20mMNaClを加えて、熱処理(37℃、10分)を行ったサンプルに由来する電気泳動の結果である。レーン2は、熱処理(45℃、10分)のサンプルに由来するものである。レーン3は、熱処理(55℃、10分)のサンプルに由来するものである。レーン4は、熱処理(65℃、10分)のサンプルに由来するものである。レーン5は、熱処理(75℃、10分)のサンプルに由来するものである。レーン6は、熱処理(85℃、10分)のサンプルに由来するものである。

(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。(C)は、(A)と同様の実験を、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAの末端領域の配列を持つ、40-merの長さのオリゴヌクレオチド20を用いて行った結果に由来するものである。(D)は(C)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真である。これらをまとめて、図17に示す。

オリゴヌクレオチド19の配列: 5'-actttttcat gaggaaqgttt ccattaaacgggtaaaatac-3' (配列番号: 20)

図17によれば、60-merのオリゴヌクレオチドを用いた三本鎖の熱安定性は、85℃付近が限界で、40-merのオリゴヌクレオチドを用いた場合には、75

℃付近が限界であることがわかる。用いるオリゴヌクレ  
 オチドの長さが60-mer以上であると、三本鎖の熱  
 安定性は、高いこともわかる。 \* [0080]  
 \* [配列表]

<110> アイシン精機株式会社  
 AISIN SEIKI CO., LTD  
 <120> 標的DNAの固定化  
 <130> 9811070  
 <160> 21  
 <210> 1  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのSnaBI断片の片末端側の  
 ヌクレオチド配列を参考にして合成  
 <400> 1  
 agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaacg ggtaaaatac 60  
 <210> 2  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのSnaBI断片の片末端側のヌ  
 クレオチド配列の逆相補鎖として合成  
 <400> 2  
 gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaaaaagt ctttagtcct caaagcctct 60  
 <210> 3  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> pBR322のScaI断片の片末端側のヌクレオチド配列を参考  
 して合成  
 <400> 3  
 cactgcataa ttctcttact gtcacgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 60  
 <210> 4  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのHincII断片の片末端側  
 のヌクレオチド配列を参考にして合成  
 <400> 4  
 ggaacagct atgacatga ttacgaattc gagctcgga cccggggatc ctctagagtc 60  
 <210> 5  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのSnaBI断片のもう一つの



片末端側のヌクレオチド配列を参考にして合成

<400> 5

tgtttttagtg tattcttttcg cctcttttcgt ttttaagtttg tgccttcgta gtgcattac 60

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ファージベクターM13mp18RFのHincII断片の片末端側のヌクレオチド配列を参考にして合成

<400> 6

ttacgaattc gagctcggta cccggggatc ctctagaagtc 40

<210> 7

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 環状pBR322のヌクレオチド配列を参考にして合成

<400> 7

gtcctccgat cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag 60

cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 120

<210> 8

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 環状pBR322のヌクレオチド配列の逆相補鎖として合成

<400> 8

actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 60

ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac 120

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ファージベクターM13mp18RFのSnaBI断片の片末端側のヌクレオチド配列を参考にして合成

<400> 9

gtattttacc cgtttaatgg aaacttcctc atgaa 35

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ファージベクターM13mp18RFのSnaBIのもう一方の片末端側のヌクレオチド配列を参考にして合成

<400> 10

gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaa 35

<210> 11

<211> 60

29

30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; pBR322のScaI断片の片末端側のヌクレオチド配列の逆相補鎖として合成

&lt;400&gt; 11

tctccgaaac tcctgatttc tgaaaaagta ctctttcaaa ggtaatttgc ccattttatg 60

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌクレオチド配列の逆相同鎖として合成

&lt;400&gt; 12

gtaatgccac tacgaaggca ccaacctaaa acgaaagagg cgaaagaata cactaaaaca 60

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌクレオチド配列を参考にして合成

&lt;400&gt; 13

aggactaaaq actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 50

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌクレオチド配列を参考にして合成

&lt;400&gt; 14

actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 40

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌクレオチド配列を参考にして合成

&lt;400&gt; 15

gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 30

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌクレオチド配列を参考にして合成

31  
 <400> 16  
 ccattaaacg ggtaaaatac  
 <210> 17  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端10  
 -merを残した末端部位の配列を参考にして合成  
 <400> 17  
 caacgggtac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt ccattaaacg 60  
 <210> 18  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端20  
 -merを残した末端部位の配列を参考にして合成  
 <400> 18  
 acgagggtac caacgggtac agaggctttg aggactaaag actttttcat gaggaagttt 60  
 <210> 19  
 <211> 60  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端30  
 -merを残した末端部位の配列を参考にして合成  
 <400> 19  
 cagcatcgga acgagggtac caacgggtac agaggctttg aggactaaag actttttcat 60  
 <210> 20  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> ファージベクターM13mp18RFのScaI断片の片側末端のヌ  
 クレオチド配列を参考にして合成  
 <400> 20  
 actttttcat gaggaagttt ccattaaacg ggtaaaatac 40

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例1の標識反応における、各反応成分の依存性を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルのアガロース電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A) レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、ファージベクターM13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、全反応成分を加えて反応を行ったサンプル。レーン2は、recAタンパクを除いてレーン1と同じ反応を行ったサンプル。レーン3は、ATP-γSを除いてレーン1と

同じ反応を行ったサンプル。レーン4は、逆相補オリゴヌクレオチドを用いて反応を行ったサンプル。レーン5は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断した標的DNAに対するオリゴヌクレオチドを用いて、反応を行ったサンプル。(B) は(A)と同じアガロースゲル電気泳動の、DNA全染色写真。(C) は(A)と同じサンプルを、0.7%アルカリ変性アガロースゲルで電気泳動した結果。

【図2】図2は実施例2の標識された標的DNAの長さを調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A) レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの

左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素HincIIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、反応を行ったサンプル。レーン2は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン1と同じ反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。(C)は(A)と同じサンプルを、制限酵素BsaHIで切断した後に、45%変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。

【図3】図3は実施例3の標識反応における、塩基配列の特異性を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。

(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、反応を行ったサンプル。レーン2は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、制限酵素ScaIで切断したpBR322 DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて反応を行ったサンプル。レーン3は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて反応を行ったサンプル。レーン4は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断した標的DNAと、制限酵素SnaBIで切断したM13mp18RF DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、全反応成分を加えて反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図4】図4は実施例4の標識反応における、標的DNAの標識部位を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断したターゲットDNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、反応を行ったサンプル。レーン2は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素EcoRIで切断したサンプル。レーン3は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、制限酵素SnaBIで切断M13mp18RF DNAのもう1つの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチド(オリゴヌクレオチド5)を用いて、反応を行ったサンプル。レーン4は、レーン3と同じサンプルを、制限酵素EcoRIで切断したサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図5】図5は実施例5の標識反応における、標的DNAの標識部位を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真であ

る。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素HincIIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、反応を行ったサンプル。レーン2は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素XbaIで切断したサンプル。レーン3は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素BamHIで切断したサンプル。レーン4は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素SmaIで切断したサンプル。レーン5は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素KpnIで切断したサンプル。レーン6は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素SacIで切断したサンプル。レーン7は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素EcoRIで切断したサンプル。レーン8は、レーン1と同じサンプルを、制限酵素BsaHIで切断したサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図6】図6は実施例6の異なるDNAポリメラーゼを用いて標識反応を行った実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成を行い、除recA後に、大腸菌DNA Polymerase Iで標識反応を行った。レーン2は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン1と同じ反応を行ったサンプル。レーン3は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成を行い、除recA後に、大腸菌DNA Polymerase I、Large fragmentで標識反応を行った。レーン4は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン3と同じ反応を行ったサンプル。レーン5は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成を行い、除recA後に、大腸菌DNA Polymerase I、Large fragment (3'-5' exoマイナス)で標識反応を行った。レーン6は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン5と同じ反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図7】図7は実施例7の異なるDNAポリメラーゼを用いて標識反応を行った実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドで三本鎖形成を行い、除 *recA* 後に、大腸菌 DNA Polymerase I、Large fragment (3' - 5' *exo*マイナス) で標識反応を行った。レーン 7 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 1 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 2 は、M13mp18 RF DNA を制限酵素 *SnaBI* で切断した標的 DNA と、その標的 DNA の末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成を行い、除 *recA* を行うことなしに、大腸菌 DNA Polymerase I、Large fragment (3' - 5' *exo*マイナス) で標識反応 (反応温度 37℃) を行った。レーン 8 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 2 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 3 は、除 *recA* を行うことなしに、大腸菌 DNA Polymerase I、Large fragment (3' - 5' *exo*マイナス) で標識反応 (反応温度 47℃) を行った。レーン 9 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 3 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 4 は、除 *recA* を行うことなしに、*Bst* DNA Polymerase I、Large fragment で標識反応 (反応温度 65℃) を行った。レーン 10 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 4 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 5 は、除 *recA* を行うことなしに、*Pyr*oBest DNA Polymerase I で標識反応 (反応温度 65℃) を行った。レーン 11 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 5 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 6 は、除 *recA* を行うことなしに、*Taq* DNA Polymerase I で標識反応 (反応温度 65℃) を行った。レーン 12 は、オリゴヌクレオチドを加えないでレーン 6 と同じ反応を行ったサンプル。(B) は (A) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。

【図 8】図 8 は実施例 8 の標的 DNA として、閉環状の DNA に対して標識反応を行った実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動を示す図面に代わる写真である。(A) レーン M は DNA サイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン 1 は、pBR322 DNA を標的 DNA として、オリゴヌクレオチド 7 を用いて標識反応を行ったサンプル。レーン 2 はオリゴヌクレオチド 7 の逆相補オリゴヌクレオチド 8 を用いて標識反応を行ったサンプル。レーン 3 はオリゴヌクレオチドを用いないで標識反応を行ったサンプル。レーン 4 は、用いた標的 DNA を標識反応を行うことなく、そのままサンプルとしたものである。(B) は (A) と同じアガロースゲルの DNA 全染色写真。

【図 9】図 9 は実施例 9 の標識反応後のオリゴヌクレオチドの状態を検討した実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A) レーン M は DNA サイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン 1 は、M13mp18

RF DNA を制限酵素 *SnaBI* で切断した標的 DNA と、その標的 DNA の末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチド (5' 末端標識) で三本鎖形成を行ったサンプル。レーン 2 は、レーン 1 と同じ三本鎖形成を行い、続いて dXTPs を加えて取り込み反応を行ったサンプル。レーン 3 は、レーン 1 と同じ三本鎖形成を行い、続いて dXTPs を加えないで取り込み反応を行ったサンプル。レーン 4 は、レーン 1 と同じ三本鎖形成を行い、続いて dXTPs (マイナス dATP) を加えて取り込み反応を行ったサンプル。レーン 5 は、レーン 1 と同じ三本鎖形成を行い、続いて dXTPs (マイナス dCTP) を加えて取り込み反応を行ったサンプル。(B) は (A) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。

【図 10】図 10 は実施例 10 の標識反応の再現性を検討した実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A) レーン M は DNA サイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン 1 は、M13mp18 RF DNA を制限酵素 *SnaBI* で切断した標的 DNA と、その標的 DNA の末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成と標識反応を行った。続いてその標識ターゲット DNA を用いて再度、標的 DNA の末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで、三本鎖形成と dXTPs を加えて取り込み反応を行ったサンプル。レーン 2 は、取り込み反応で DNA ポリメラーゼを加えないでレーン 1 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 3 は、取り込み反応で dXTPs を加えないでレーン 1 と同じ反応を行ったサンプル。レーン 4 は、取り込み反応で dXTPs の代わりに dCTP を加えてレーン 1 と同じサンプル。(B) は (A) と同じアガロースゲルの、DNA 全染色写真。

【図 11】図 11 は実施例 11 のビオチン標識標的 DNA の固相への固定化を示すデータ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。レーン M は DNA サイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン 1 は、M13mp18 RF DNA を制限酵素 *SnaBI* で切断した標的 DNA と、その標的 DNA の末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドで三本鎖形成を行い、続いて、ビオチン標識ヌクレオチドを用いて、標識反応を行った。ビオチンで末端標識された標的 DNA を、ストレプトアビジン結合磁気ビーズに補足させた後、ビーズ上で 2 本鎖ターゲット DNA のビオチン標識されていない片側鎖をアルカリ変性により解離させた。このターゲット DNA が結合したビーズを鋳型として、ターゲット DNA の両末端配列を持つプライマーを用いて PCR 反応を行い、その DNA 産物をサンプルとしたものである。レーン 2 は、レーン 1 と同じ反応を、M13mp18 RF DNA を制限酵素 *SnaBI* で切断した標的 DNA と、制限酵素 *SnaBI* で切断 M13mp18 RF DNA のもう 1 つの末端領

域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて行ったサンプル。レーン3は、レーン1と同じ反応を、オリゴヌクレオチドを加えないで行ったサンプル。レーン4は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAを鋳型としてPCRを行ったサンプルで、PCR産物のサイズマーカー。

【図12】図12は実施例12の生体分子間相互作用解析装置・I Asysを用いた、標識標的DNAの固相への固定化のデータを示す図面である。(a)は、ストレプトアビジン結合のセンサー表面に、ビオチン標識反応を行った標的DNAを結合させる段階。(b)は、固相化された2本鎖DNAを、アルカリ変性により1本鎖に解離させる。続いて反応キュベットの緩衝液を、6×SSCに置き換える段階。(c)は、標的DNAに相補的な1本鎖DNAを加えた段階。(d)は、アルカリ変性により1本鎖DNAを除く。続いて反応キュベットの緩衝液を、6×SSCに置き換える段階。(e)は、標的DNAに無関係な配列をもつ1本鎖DNAを加える段階。(f)は、標的DNAに相補的な1本鎖DNAを加える段階。

【図13】図13は実施例13の三本鎖形成反応における、各反応成分の依存性を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、全反応成分を加えて三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン2は、recAタンパクを除いてレーン1と同じ反応を行ったサンプル。レーン3は、ATP-γSを除いてレーン1と同じ反応を行ったサンプル。レーン4は、逆相補オリゴヌクレオチド(オリゴ配列2)を用いて反応を行ったサンプル。レーン5は、逆相同オリゴヌクレオチド(オリゴ配列6)を用いて反応を行ったサンプル。レーン6は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したターゲットDNAに対するオリゴヌクレオチド(オリゴ配列3)を用いて、反応を行ったサンプル。レーン7は、pBR322 DNAを制限酵素ScaIで切断したターゲットDNAと、そのターゲットDNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチド(オリゴ配列3)を用いて、全反応成分を加えて三本鎖形成反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図14】図14は実施例14の三本鎖形成反応における、用いるオリゴヌクレオチドの配列方向性を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵

素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチド(5'末端標識)を用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン2は、該オリゴヌクレオチド配列に対して、逆相補配列を持つオリゴヌクレオチド(5'末端標識)を用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン3は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAのもう1つの末端領域の配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン4は、オリゴ配列に対して、逆相補配列を持つオリゴヌクレオチド(5'末端標識)を用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。

(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

【図15】図15は実施例15の三本鎖形成反応に必要なとされる、オリゴヌクレオチドの長さを調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つ60-merオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン2は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端領域の配列を持つ50-merオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン3は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端領域の配列を持つ40-merオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン4は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端領域の配列を持つ30-merオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン5は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端領域の配列を持つ20-merオリゴヌクレオチドを用いて、三本鎖形成反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

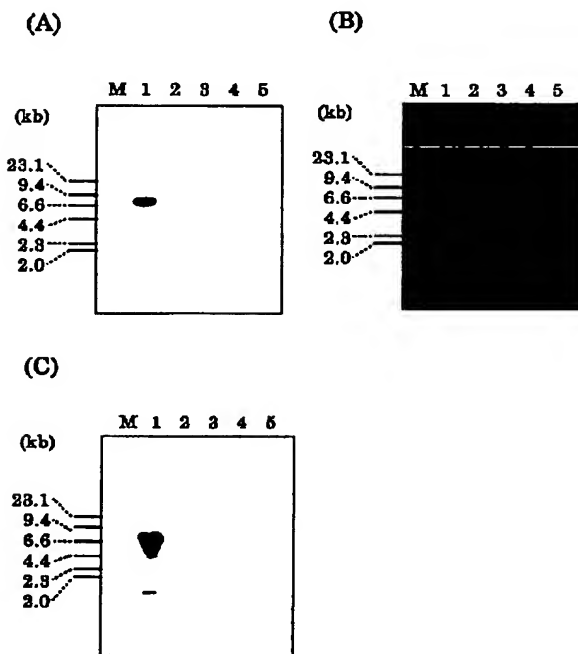
【図16】図16は実施例16の三本鎖形成反応に必要なとされる、オリゴヌクレオチド配列の位置を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つ60-merオリゴヌクレオチドを用いて三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン2は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端から、10-mer鎖内に入った領域の配列を持つ60merオリゴヌクレオチドを用い

て三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン3は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端から、20-mer鎖内に入った領域の配列を持つ60-merオリゴヌクレオチドを用いて三本鎖形成反応を行ったサンプル。レーン4は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNA末端から、30-mer鎖内に入った領域の配列を持つ60-merオリゴヌクレオチドを用いて三本鎖形成反応を行ったサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

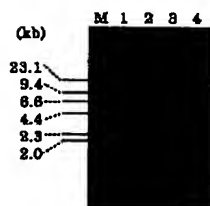
【図17】図17は実施例17の三本鎖形成反応における、オリゴヌクレオチド配列の熱安定性を調べた実験データ。それぞれ、下記のサンプルの電気泳動の結果を示す図面に代わる写真である。(A)レーンMはDNAサイズマーカーで、そのサイズをデータの左に示す。レーン1は、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBI

\*B Iで切断した標的DNAと、その標的DNAの末端領域の配列を持つ60-merオリゴヌクレオチドを用いて三本鎖形成反応を行い、除recA後に、1×SSC中で熱処理(37℃、10分)を行ったサンプル。レーン2は、熱処理(45℃、10分)のサンプル。レーン3は、熱処理(55℃、10分)のサンプル。レーン4は、熱処理(65℃、10分)のサンプル。レーン5、熱処理(75℃、10分)のサンプル。レーン6は、熱処理(85℃、10分)のサンプル。(B)は(A)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。(C)は、(A)と同じ実験を、M13mp18RF DNAを制限酵素SnaBIで切断した標的DNAの末端領域の配列を持つ、40-merの長さのオリゴヌクレオチドを用いて、行った。(D)は(C)と同じアガロースゲルの、DNA全染色写真。

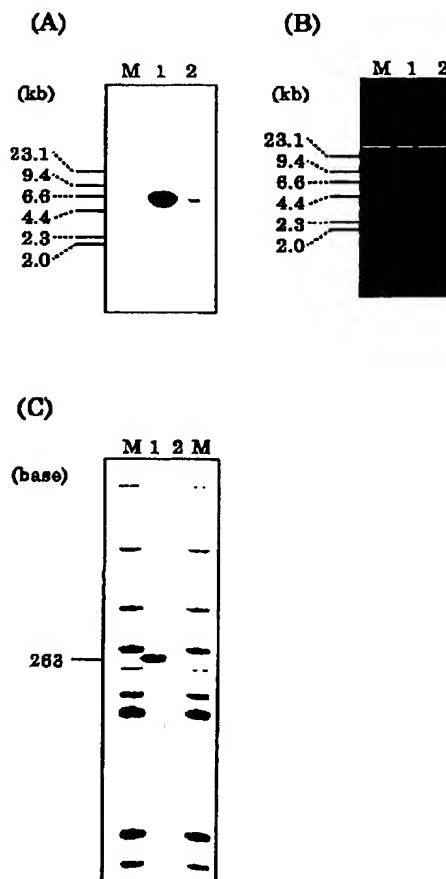
【図1】



【図11】

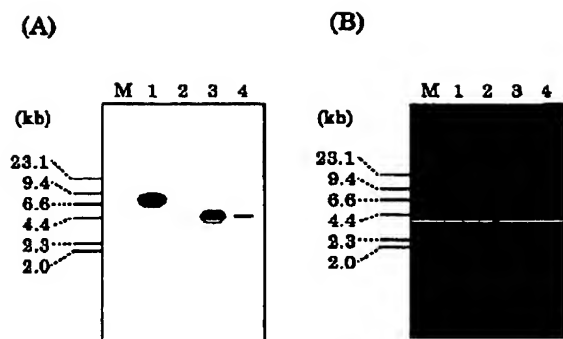


【図2】

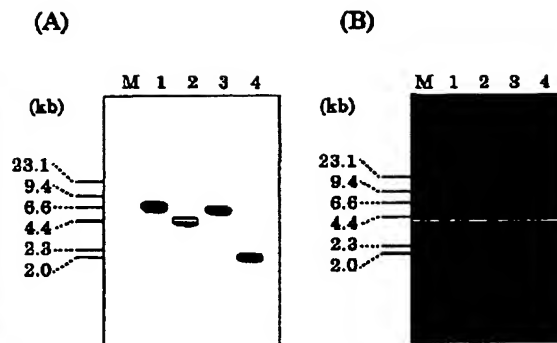




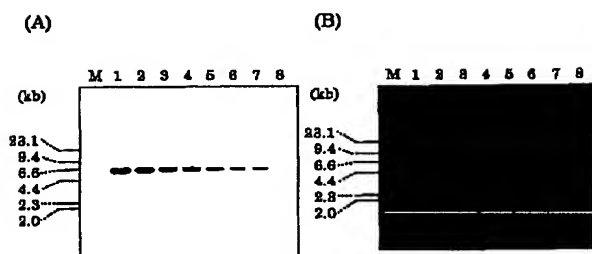
【図3】



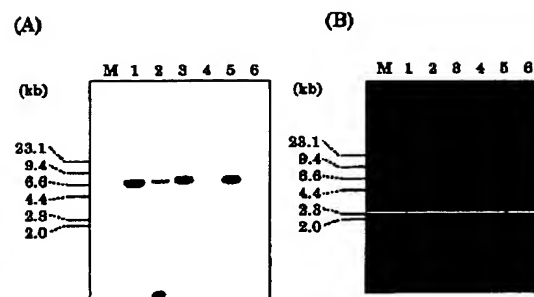
【図4】



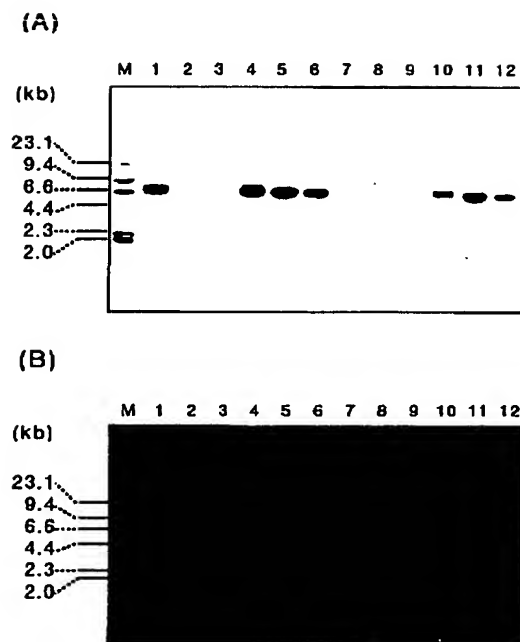
【図5】



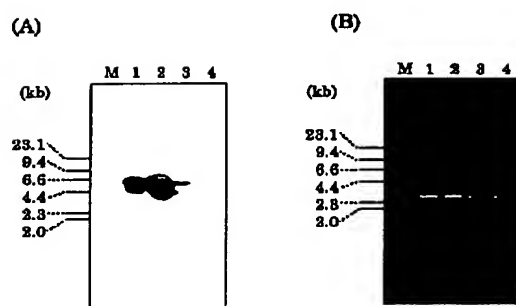
【図6】



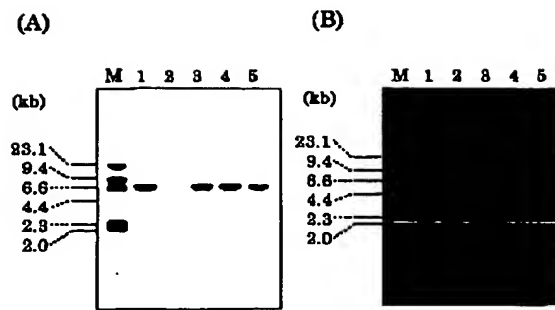
【図7】



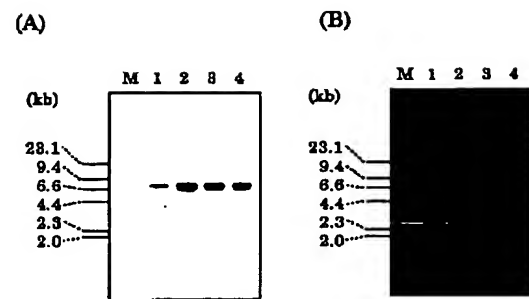
【図8】



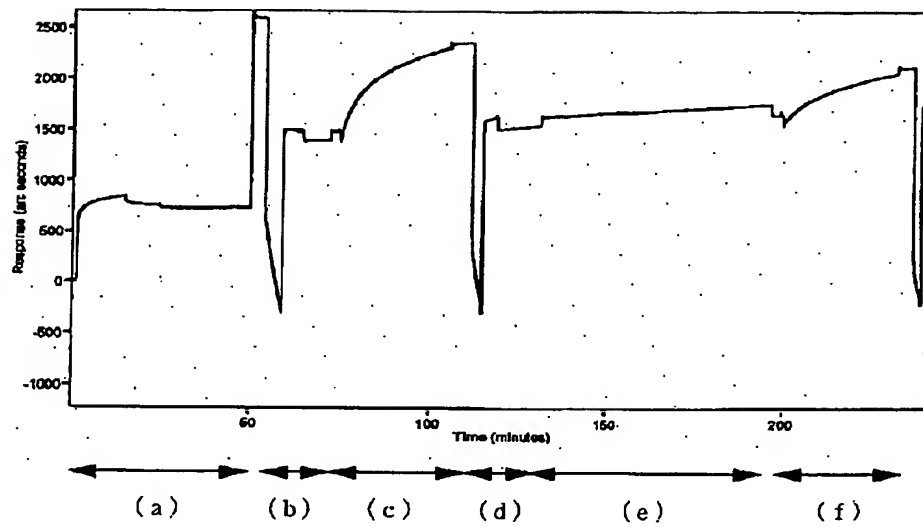
【図9】



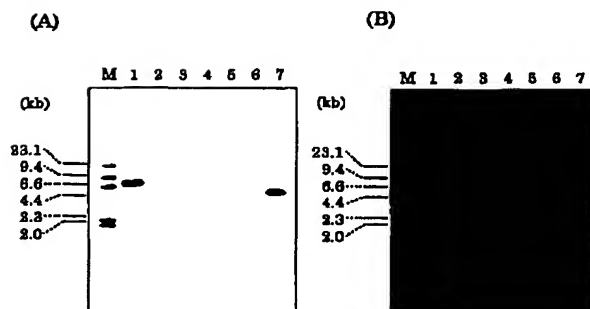
【図10】



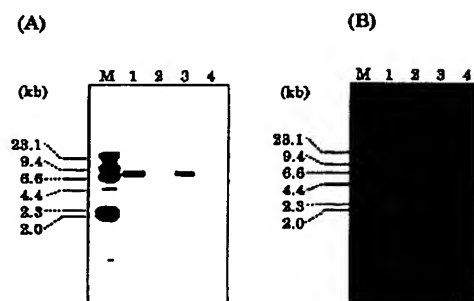
【図12】



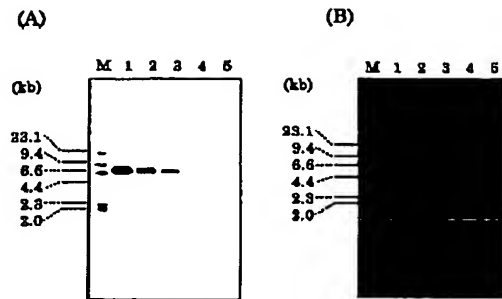
【図13】



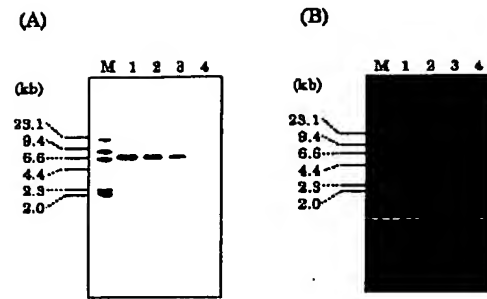
【図14】



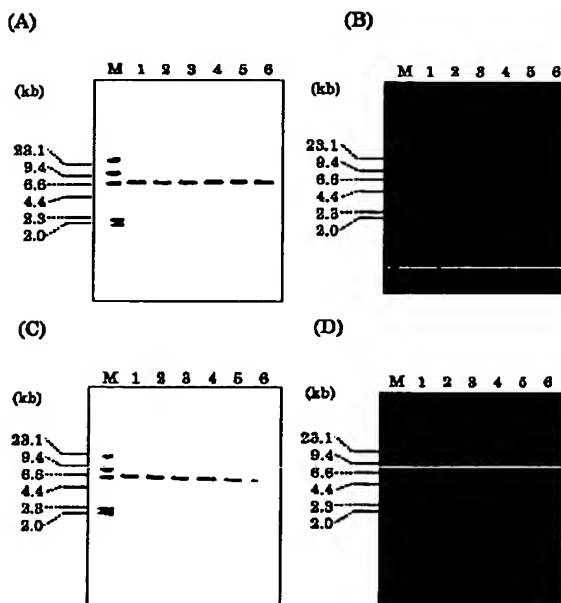
【図15】



【図16】



【図17】



フロントページの続き

F ターム(参考) 48024 AA11 AA20 CA01 EA03 HA08  
 HA11  
 48029 AA23 BB20 CC03 CC08  
 48063 QA01 QA12 QA13 QQ42 QR08  
 QR32 QR41 QR42 QR48 QR83  
 QS03 QS16 QS34 QS36